

MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

Módulo 8: Detecção e identificação dos
fungos de importância médica

Copyright © 2012 Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Todos os direitos reservados. É permitida a reprodução parcial ou total dessa obra, desde que citada a fonte e que não seja para venda ou qualquer fim comercial.

A responsabilidade pelos direitos autorais de textos e imagens dessa obra é da área técnica.

A Anvisa, igualmente, não se responsabiliza pelas idéias contidas nessa publicação.

1ª edição – 2010

Elaboração, distribuição e informações:

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

SIA Trecho 5, Área Especial 57

CEP: 71205-050 Brasília – DF

Tel.: (61) 3462-6000

Home page: www.anvisa.gov.br

Diretoria

Dirceu Brás Aparecido Barbano – Diretor-Presidente

Jaime Cesar de Moura Oliveira

José Agenor Álvares da Silva

Adjuntos de Diretor

Luiz Roberto Klassmann

Luciana Shimizu Takara

Neilton Araujo de Oliveira

Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde – GGTS

Diana Carmem Almeida Nunes de Oliveira

Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde – GVIMS

Magda Machado de Miranda

Coordenação Técnica:

Ana Clara Ribeiro Bello dos Santos – Anvisa

Carlos Emílio Levy – Universidade de Campinas-SP

Redação:

Angélica Zaninelli Schreiber – Universidade de Campinas (UNICAMP)-SP

Carlos Emilio Levy – Universidade de Campinas (UNICAMP)-SP

Claudia Maria Leite Maffei – Universidade de São Paulo(USP)-SP

Marcia de Souza Carvalho Melhem – Instituto Adolfo Lutz (IAL)-SP

Revisão técnica – Anvisa:

André Anderson Carvalho

Fabiana Cristina de Sousa

Heiko Thereza Santana

Magda Machado de Miranda

Suzie Marie Gomes

Projeto Gráfico e Diagramação

All Type Assessoria Editorial Ltda

Ficha Catalográfica

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 8: Detecção e identificação de fungos de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

47p.: il.9 volumes

ISBN

1. Infecção Hospitalar – Controle. 2. Infecção em Serviços de Saúde. 3. Microbiologia Clínica. 4. Vigilância Sanitária em Serviços de Saúde. 5. Resistência microbiana. I. Título.

SUMÁRIO

Apresentação	5
Capítulo 1: Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica	7
1.1 Introdução	8
1.1.1 Fungos e infecção hospitalar	8
1.2 Coleta, transporte e armazenamento de amostras	12
1.2.1 Recomendações gerais de coleta e transporte de amostras	12
1.3 Processamento de amostras	15
1.3.1 Exame microscópico de amostras	17
1.3.2 Exame microscópico direto com hidróxido de potássio (KOH) a 20%	17
1.3.3 Exame microscópico direto com tinta nanquim (tinta da China)	17
1.3.4 Exame microscópico com coloração pelo método de Gram	18
1.3.5 Exame microscópico com coloração panótica (Giemsa, Leishman ou Wright)	18
1.3.6 Cultura de amostras biológicas para isolamento de fungos	20
1.3.7 Meios de cultura	20
1.3.8 Procedimentos para cultura	21
1.4 Identificação de fungos	24
1.4.1 Identificação de leveduras (morfológica e bioquímica)	25
1.4.2 Prova do tubo germinativo	28
1.4.3 Cultivo em lâmina para prova de filamentação e produção de clamidósporo	28
1.4.4 Prova da urease	29
1.4.5 Prova de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio ou auxanograma	29
1.4.6 Fermentação de açúcares ou zimograma	30
1.4.7 Métodos comerciais para identificação de leveduras	30
1.4.8 Identificação de fungos filamentosos	30
1.4.9 Técnica de microcultivo para fungos filamentosos	31
1.4.10 Identificação de fungos dimórficos	32
1.5 Descrição das principais micoses observadas no Brasil	32
1.5.1 Micoses superficiais	32
1.5.2 Micoses subcutâneas e profundas	33
1.5.3 Micoses oportunistas	36
1.6 Corantes e meios de cultura	42
Corante Azul de lactofenol-algodão	42
1.7 Glossário	44
1.8 Referências	44

APRESENTAÇÃO

A resistência microbiana é um grave problema mundial, estando associada ao aumento do tempo de internação, dos custos do tratamento e das taxas de morbidade e mortalidade dos pacientes. O uso indiscriminado e incorreto dos antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar é reconhecidamente um importante fator de risco para o aparecimento e a disseminação da resistência microbiana.

Nesse contexto, insere-se o Laboratório de Microbiologia, que tem como objetivo não apenas apontar o responsável por um determinado estado infeccioso, mas também indicar, através do monitoramento de populações microbianas, qual o perfil dos micro-organismos que estão interagindo com o organismo humano, possibilitando a indicação de tratamentos mais adequados. Para o desempenho satisfatório dessa função, é fundamental que os laboratórios de microbiologia possuam estrutura capaz de estabelecer informações sobre a melhor amostra biológica, reconhecer a microbiota e os contaminantes, identificar micro-organismos associados à infecção ou com propósitos epidemiológicos, obter resultados rápidos em casos de emergência, realizar o transporte rápido das amostras e manter uma educação contínua em relação aos aspectos da infecção relacionada à assistência à saúde.

Tendo em vista esses aspectos e considerando que a microbiologia é um campo muito dinâmico, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa, em cooperação com a Organização Pan-Americana da Saúde – OPAS, propõe a terceira revisão do Manual de Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde, buscando atualizar informações nos temas considerados essenciais e contando com um seleto e conceituado corpo editorial. O manual é composto por nove módulos, a saber: Módulo 1 – Biossegurança e manutenção de equipamentos em laboratório de microbiologia clínica; Módulo 2 – Controle externo da qualidade; Módulo 3 – Principais Síndromes Infecciosas; Módulo 4 – Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final; Módulo 5 – Tecnologias em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos; Módulo 6 – Detecção e identificação de bactérias de importância médica; Módulo 7 – Detecção e identificação de micobactérias de importância médica; Módulo 8 – Detecção e identificação de fungos de importância médica e Módulo 9 – Infecções virais.

A Anvisa e a OPAS esperam com essa publicação contribuir para que os laboratórios de microbiologia possam assimilar e alcançar novos níveis de complexidade laboratorial, atendendo às exigências e características próprias de cada unidade hospitalar, além de subsidiar a adoção de procedimentos básicos padronizados nesses serviços.

Capítulo 1:

Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica

Angélica Zaninelli Schreiber

Farmacêutica - Profa. Dra. do Departamento de Patologia Clínica
Responsável pelo Laboratório de Investigação em Fungos - Faculdade de Ciências
Médicas da UNICAMP
Divisão de Patologia Clínica - Setor de Micologia do
Laboratório de Microbiologia - HC-UNICAMP

Claudia Maria Leite Maffei

Médica - Profa. Dra. do Departamento de Biologia Celular
e Molecular e Bioagentes Patogênicos
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
Laboratório de Micologia Médica do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto

Marcia de Souza Carvalho Melhem

Farmacêutica –Bioquímica , Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz
Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências
da Coordenadoria de Controle de Doenças
Secretaria Estadual da Saúde de São Paulo

Coordenação do Capítulo

Carlos Emilio Levy

Médico - Prof. Dr. do Departamento de Patologia Clínica
Fac. Ciências Médicas da UNICAMP
Divisão de Patologia Clínica - Setor de Bacteriologia - Hospital das Clínicas da UNICAMP

1.1 Introdução

1.1.1 Fungos e infecção hospitalar

Os avanços da medicina que permitem a sobrevivência de pacientes críticos e imunocomprometidos, uso de antimicrobianos de amplo espectro, implementação das técnicas de transplantes de órgãos sólidos e de medula óssea são alguns dos fatores que têm transformado a rotina diagnóstica dos laboratórios de microbiologia e micologia. Antes preocupados apenas com a detecção de patógenos fúngicos clássicos (Quadro 1), hoje se deparam cada vez mais com a visualização e isolamento de fungos considerados saprófitas, oportunistas e potencialmente patogênicos, com a difícil tarefa de identificá-los e, em conjunto com o clínico, valorizar ou não esse achado no material clínico coletado.

Quadro 1 Principais infecções micóticas que acometem os seres humanos no Brasil

MICOSES	
CLÁSSICAS	OPORTUNISTAS
<ul style="list-style-type: none"> – Superficiais • Pitiríase versicolor – Cutâneas • Dermatofitoses – Subcutâneas • Cromomicose, esporotricose – Profundas • Paracoccidioidomicose, Histoplomose 	<ul style="list-style-type: none"> • Superficiais <ul style="list-style-type: none"> – Candidíases – Dermatomicoses • Invasivas <ul style="list-style-type: none"> – Candidemia – Criptococose – Aspergilose – Fusariose – Zigomicoses – Outras hialohifomicoses – Feohifomicoses

Agentes como espécies de *Aspergillus*, *Candida*, *Cryptococcus* e zigomicetos, considerados, anteriormente, como contaminantes ambientais e, portanto, de pouca importância clínica, são agora conhecidos agentes causais de enfermidades disseminadas, tais como as endocardites, infecções pulmonares, ceratites, entre outras, em pacientes imunodeprimidos. Dessa forma, esses fungos devem ser considerados, ao lado dos patógenos clássicos, como possíveis agentes de quadros infecciosos.

Dentre as centenas de espécies descritas, leveduras do gênero *Candida* são os importantes agentes de infecção hospitalar e representam um desafio para a sobrevivência de pacientes com doenças graves e aqueles em período pós-operatório. Hospitais norte-americanos com sistema de vigilância operante notificaram espécies de *Candida* como 6º patógeno nosocomial e a

4ª causa mais comum de infecções de corrente sanguínea, adquiridas em hospitais.

Diferentes espécies de *Candida* podem causar quadros de fungemia, a saber: *Candida albicans*, *Candida glabrata* (*Torulopsis glabrata*), *Candida tropicalis*; *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida guilliemondii*, *Candida lusitanae*, *Candida lipolytica*, *Candida kefyr*, *Candida inconspicua*, *Candida norvergensis* e *Candida catenulata*. Um grupo europeu realizou na década de 90 um estudo multicêntrico e, por análise univariada, concluíram ser *C. glabrata* a espécie associada à maior taxa de mortalidade e que o óbito estava relacionado com maior idade e severidade da doença de base do paciente.

A manifestação clínica mais comum nas candidíases hospitalares é febre. A candidemia pode ser definida como a ocorrência de duas ou mais culturas positivas para a mesma espécie de *Candida* provenientes de amostras diferentes, coletadas após 72 horas da admissão. A infecção invasiva por *Candida* spp pode ser também considerada quando seu isolamento ocorrer a partir de material clínico estéril, associado a, pelo menos, um outro sinal de infecção. A sensibilidade da hemocultura para *Candida* spp é baixa, aproximadamente 50% dos pacientes com infecção invasiva podem ter culturas negativas. Além disso, se houver infecção bacteriana concomitante, essa pode diminuir a chance do isolamento da levedura.

Os fatores de risco reconhecidos para infecção invasiva por *Candida* spp são:

- Permanência > 4 dias em UTI
- Antibiótico-terapia de largo espectro
- Cirurgia abdominal
- Cateterização venosa central
- Nutrição parenteral total
- Imunodepressão
- Índice APACHE II > 10
- Ventilação mecânica > 48h
- Neutropenia
- Quimioterapia citotóxica

O gênero *Candida* é, sem dúvida, o mais importante, mas existem outras leveduras no ambiente hospitalar, tanto em vegetais, ar atmosférico e água quanto na pele e no trato gastrointestinal dos pacientes e funcionários, que podem causar quadros infecciosos. Os principais gêneros são *Pichia* spp (*Hansenula* spp), *Rhodotorula* spp e *Trichosporon* spp.

Em adição, fungos filamentosos presentes no ambiente hospitalar também podem causar infecção em pacientes suscetíveis. O gênero *Aspergillus* spp (*Aspergillus terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger*) é o mais citado na literatura como fungo oportunista, especialmente em pacientes submetidos a transplante de medula óssea e neutropênicos. A inalação de esporos é a via mais comum de transmissão e os surtos de aspergilose podem ser associados a reformas e construções, dentro e ao redor de hospitais.

Doença pulmonar e, mais raramente, sinusite são as manifestações de aspergilose. Outros gêneros tais como: *Fusarium* sp, *Acremonium* sp, *Penicillium* sp, outros hifomicetos como zigomicetos (*Rhizopus* sp, *Mucor* sp) e alguns feohifomicetos (“fungos negros” ou demácios), também dispersos no ar, são capazes de causar formas localizadas ou disseminadas de infecção hospitalar.

Diante dessas condições, recomenda-se monitoração com exames micológicos de amostras biológicas dos pacientes, tais como sangue, escarro, pontas de catéteres intravasculares, líquido peritoneal e urina. Culturas positivas podem significar apenas colonização, mas podem conduzir à doença invasiva subsequente.

Estudo prospectivo em pacientes cirúrgicos de UTI mostrou que 38% de 29 pacientes desenvolveram infecção após colonização. A colonização pode ser demonstrada por análise de três ou mais amostras, coletadas do mesmo local ou de locais diferentes, do mesmo paciente, em dias consecutivos.

Nesse módulo, será apresentada uma visão geral das principais infecções fúngicas, para que os microbiologistas possam adquirir certa habilidade para identificar fungos isolados de amostras biológicas. Para um estudo mais completo sobre diagnóstico de infecções fúngicas, recomendam-se as referências citadas ao final do capítulo.

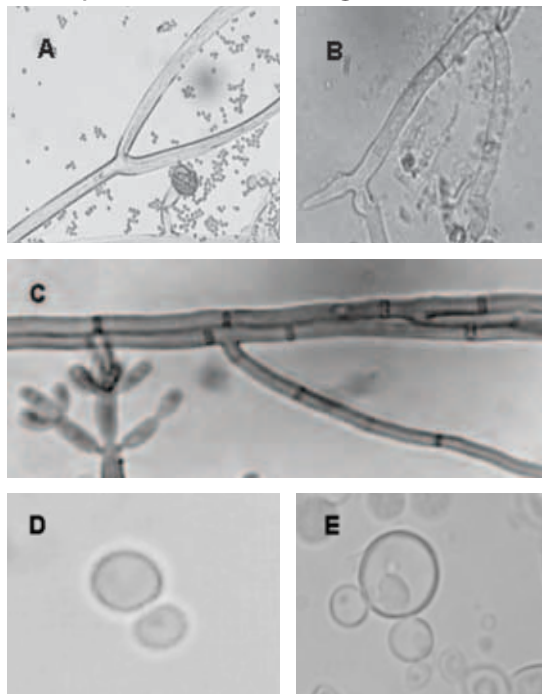
Características gerais dos fungos

Fungos são seres dispersos no meio ambiente, em vegetais, ar atmosférico, solo e água e, embora sejam estimados em 250 mil espécies, menos de 150 foram descritos como patógenos aos seres humanos.

Os fungos de interesse médico, agentes de micoses, apresentam-se sob dois tipos morfológicos: leveduras, prevalentemente unicelulares e bolores ou fungos filamentosos, que são multicelulares (Figura 1). Há ainda importantes agentes de micoses endêmicas que, na dependência principalmente da temperatura, mas sob influência também do teor de CO₂ e condições nutri-

cionais, podem se apresentar sob ambas as formas sendo chamados fungos dimórficos.

Figura 1 Estruturas microscópicas básicas de fungos filamentosos (a, b, c) e leveduras (d, e).



Leveduras são fungos capazes de colonizar o homem e animais e, frente à perda do equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diversos quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas. De modo contrário, fungos filamentosos, ou bolores, normalmente, não fazem parte da microbiota animal e, portanto o homem não é um reservatório importante para esse grupo de fungos. As portas de entrada no hospedeiro são as vias aéreas superiores ou quebra na barreira epidérmica após traumatismos com objetos perfuro-cortantes.

As leveduras têm como estrutura primária, visível ao microscópio ótico a partir de material clínico ou colônias em cultura, células que se reproduzem por brotamento, único ou múltiplo, em geral, de forma arredondada. Essas células são esporos de origem assexual e são denominadas blastoconídios. Alguns gêneros de leveduras menos importantes em micologia médica, reproduzem-se por fissão. Sob determinadas condições, as leveduras podem produzir pseudohifas (importantes para o processo de identificação presumtiva de espécies do gênero *Candida*) ou até mesmo hifas verdadeiras.

A macromorfologia das colônias de leveduras a partir de crescimento em meios não diferenciais como ágar sabouraud dextrose não permite a diferenciação de gêneros. A exceção é a colônia mucoide característica do gê-

nero *Cryptococcus*. Assim, a identificação de leveduras é realizada, principalmente, por características fisiológicas.

Os fungos filamentosos possuem como elemento constituinte básico a hifa, que pode ser septada ou não septada (cenocítica), hialina (hifomicetos) ou demáceas (feo-hifomicetos). A partir da hifa formam-se esporos, para propagação das espécies. Na grande maioria dos fungos, os esporos podem ser chamados de conídios, pois nascem diretamente delas ou sobre estruturas ligadas a elas.

Esses conceitos fundamentais representam a base para a identificação de um fungo, pois a classificação de filamentosos é feita, em geral, pela associação de características morfológicas macroscópicas (cor, aspecto, textura da colônia, produção de pigmento difusível no meio, etc.), microscópicas (forma e cor da hifa, presença ou não de septos, tipo e arranjo de esporos, etc.) e de velocidade de crescimento (lenta, moderada ou rápida).

1.2 Coleta, transporte e armazenamento de amostras

O tipo e a qualidade da amostra biológica, submetida ao laboratório de micologia, são fatores pré-analíticos extremamente importantes para o sucesso do isolamento e identificação do verdadeiro agente etiológico de infecções fúngicas.

Para tanto, a coleta do material biológico, seu transporte e armazenamento adequados devem ser cuidadosamente considerados.

O correto diagnóstico laboratorial micológico também depende de outros aspectos como:

- experiência do profissional que vai executar o exame;
- adequada comunicação entre os clínicos, vigilância e laboratório, essencial para direcionamento do tipo de amostra e quantidade a ser coletada;
- cuidados de coleta, frascos e meios utilizados para transporte e armazenamento das amostras;
- identificação correta das amostras, incluindo a identificação do paciente, data de coleta, presunção de diagnóstico, para auxiliar no direcionamento das análises laboratoriais e tempo de resposta ao clínico pelo laboratório.

1.2.1 Recomendações gerais de coleta e transporte de amostras

- A esterilização e desinfecção dos materiais necessários deverá ser realizada previamente, conforme recomendações específicas.

- Lavar as mãos e secá-las.
- As amostras devem ser identificadas com nome do paciente, número de registro hospitalar (quando for o caso), tipo de amostra e data da coleta, entre outras informações adicionais para auxiliar o laboratório no direcionamento dos exames.
- Coletar a amostra biológica após antissepsia e colocá-la em recipiente estéril e vedado, conforme orientação para pesquisa de agente, em quantidade suficiente (>2 mL ou $0,5\text{ cm}^3$ ou duplicada) e no período de coleta apropriado, conforme especificação de agente em estudo, para permitir todos os procedimentos laboratoriais necessários.
- Os *swabs* são usados para coleta apenas para realização do exame cultura, de materiais tais como: ouvido, nasofaringe, orofaringe e boca. Esses devem ser colocados em tubos contendo salina estéril e devem ser transportados o mais rápido possível e/ou conservados a 4°C durante o prazo de 8 a 10 horas, de modo a evitar a dessecação da amostra.
- Os materiais ditos contaminados, tais como urina, fezes, pus, secreções de feridas ou trato respiratório, devem ser enviados, sob refrigeração a 4°C , ao laboratório, o mais rápido possível, até 18 horas.
- Líquor e líquidos cavitários devem ser coletados sob cuidados de antissepsia antes da punção e enviados em tubo estéril selado hermeticamente e transportados o mais rápido possível, para assegurar o diagnóstico, mantidos à temperatura ambiente.
- Sangue e material de punção de medula óssea são os únicos materiais biológicos que devem ser semeados diretamente, em frascos contendo meio de cultura líquido ou bifásico (líquido sobre sólido), de modo a evitar coagulação e consequente diminuição da sensibilidade do exame, o transporte deve ser em temperatura ambiente, entretanto encaminhar o mais rápido possível ao laboratório, uma vez que o processamento dessas amostras deve ser realizado em, no máximo, 8 a 9 horas.

Recomendações adicionais:

- Sempre que possível, coletar amostras antes do início da terapia específica e, particularmente, para lesões cutâneas de pele e unhas, orientar o paciente para evitar uso de medicação tópica por 4 a 5 dias antes da coleta de escamas.
- A requisição médica que acompanha a amostra deve conter, sempre que possível, as hipóteses diagnósticas que auxiliarão o micologista na escolha da coloração e do meio de cultura mais adequado para o isolamento do agente etiológico suspeitado.
- Em pacientes imunodeprimidos ou muito debilitados o estudo de um mesmo tipo de amostra biológica, coletada em 2 ou 3 dias consecutivos, é importante para a interpretação correta de resultados positivos para

fungos considerados como saprófitas, ou seja, contaminantes do meio ambiente, ou mesmo, constituinte da microbiota normal do paciente. Nesses pacientes, os fungos saprófitas podem se tornar oportunistas e comportarem-se como patógenos.

Quadro 2 Procedimentos para coleta de amostras

Material Clínico	Procedimento de coleta
Escarro	Recolher, de preferência, a primeira expectoração da manhã, após gargarejo com água limpa ou fervida, em frasco de boca larga, esterilizado. Não deve conter saliva.
Aspirado gástrico	Aspirar cerca de 5 a 10 ml de suco gástrico, através de sonda nasogástrica, pela manhã, em jejum.
Aspirado traqueal e secreção obtida por broncoscopia	Procedimento realizado por médico treinado. O material colhido deve ser colocado em recipiente estéril.
Sangue e aspirado de medula óssea	Fazer antisepsia rigorosa no local da punção e coletar cerca de 5 a 6 ml de sangue venoso, que deverá ser injetado diretamente em frasco contendo meio de cultura (ver detalhes no próximo item). A última gota de material deve ser distendida em uma lâmina de microscopia, para coloração de Giemsa.
Líquor	Fazer antisepsia rigorosa no local da punção. Coletar 2 ml ou mais, para exame microscópico e cultura para fungos. Os tubos na rotina hospitalar devem ser usados na seguinte sequência: 1ª exame bioquímico, 2ª exame de celularidade, 3ª microbiológico, reduzindo assim a possibilidade de isolamento de contaminantes da pele. Entretanto, a coleta da amostra em tubos específicos para cada um desses exames aumenta a sensibilidade do exame micológico e, por isso, deve ser recomendada.
Tecido obtido por biópsia, necropsia e peças operatórias	Colher assepticamente, utilizando instrumentos estéreis e colocar o material em recipiente estéril, com salina. Não adicionar nenhum líquido fixador.
Urina	A amostra biológica mais apropriada para o diagnóstico de micose do trato urinário é obtida por sondagem ou citoscopia. Quando não for possível, e para evitar contaminação com microrganismos presentes nas áreas vizinhas, fazer limpeza prévia da região perineal com água e sabão, desprezar o primeiro jato de urina da manhã, e colher 3 a 5 ml de urina em frasco estéril. Coleções de 24 horas não têm valor para diagnóstico micológico.
Fezes	Fazer lavagem prévia da região anal com água e sabão, coletar porções de fezes em recipiente estéril com tampa ou <i>swab</i> anal, mergulhar o <i>swab</i> em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Secreção de conduto auditivo externo	Colher material por curetagem da lesão ou com <i>swab</i> estéril. Mergulhar o <i>swab</i> umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Material de Micose ocular	O melhor método para recuperação de fungos requer raspado de córnea, aspiração de líquido intra-ocular ou biópsia. A coleta com auxílio de <i>swab</i> não é indicada em local de drenagem.
Lesão de nariz e seios paranasais	Coletar secreção, material necrótico ou tecido obtido por biópsia em recipiente estéril.

Material Clínico	Procedimento de coleta
Mucosa oral e orofaringe	Coletar com <i>swab</i> estéril o material de lesão de mucosa jugal, papilas linguais ou região tonsilar. Mergulhar o <i>swab</i> umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Secreção vaginal	Com auxílio de espéculo, coletar material da lesão ou do fundo de saco vaginal com <i>swab</i> estéril. Mergulhar o <i>swab</i> umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Líquidos corporais (pleural, ascítico, pericárdico e sinovial)	Fazer assepsia rigorosa no local da punção. Coletar cerca de 5 a 10mL de líquido em tubo de ensaio estéril.
Pus e material de abscesso	Devem ser colhidos de preferência, por aspiração de abscessos fechados, com seringa e agulha estéril. Se a lesão for aberta, limpar o local com gaze esterilizada embebida em salina estéril, para eliminar os exsudatos superficiais que são altamente contaminados com bactérias. A seguir, colher o material com <i>swab</i> . Mergulhar o <i>swab</i> umedecido em salina estéril e enviar o tubo ao laboratório.
Pele e pelos	Se possível, descontaminar a pele com álcool 70% antes da coleta. Raspar com lâmina de bisturi as escamas cutâneas da borda das lesões. Pode-se utilizar também uma lâmina de microscopia. Colocar o material entre duas lâminas limpas, de preferência esterilizadas, vedando-se as bordas das lâminas com fita adesiva para evitar perda do material. Os pelos tonsurados, devem ser retirados com pinça estéril e acondicionados entre lâminas ou em potes, de preferência esterilizados.
Unhas	Fazer limpeza prévia das unhas escovando com água e sabão. Cortar com tesoura e desprezar a parte descolada da unha e, com lâmina de bisturi, raspar as áreas mais profundas e pulverulentas. Colocar esse material entre lâminas e vedá-las com fita adesiva.

1.3 Processamento de amostras

O sucesso na visualização e isolamento do agente etiológico depende, além da coleta, transporte, conservação e armazenamento adequados e volume suficiente da amostra, de seu processamento correto antes do exame micológico. As seguintes recomendações devem ser cuidadosamente seguidas para boa resolução diagnóstica:

- **Pelos, cabelos, escamas de unha e pele** devem ser aliquotadas para exame micoscópico direto e cultura, pois para exame são clarificadas com solução aquosa de KOH a 20% e, para cultura, não podem sofrer nenhum tratamento prévio, sendo por isso, inoculadas diretamente na superfície do meio de cultura.
- **Líquor, secreções e fluídos corporais** como líquido pleural, ascítico, sinovial, pericárdico, aspirado transtraqueal, lavado gástrico e broncoalveolar (BAL) devem ser concentrados por centrifugação (1500 a 2000 rpm por 10 minutos). Os materiais coletados com *swabs* devem ser eluídos em solução salina e também devem

ser centrifugados. O sedimento obtido é o material adequado para o exame microscópico e semeadura em meios de cultura.

- Para **urina**, é recomendável que uma alíquota (alça calibrada) seja semeada, por esgotamento, sobre o meio de cultura distribuído em placa de Petri, para exame quantitativo, pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). A outra alíquota deve ser centrifugada (1500 a 2000 rpm por 10 minutos) e o sedimento será utilizado para exame microscópico e nova semeadura em tubo (cultura qualitativa).
- **Escarro** pode ser digerido com enzima (v/v) N-acetil-L-cisteína (250 mg de enzima dissolvidas em 1 L de solução-tampão citrato ou solução fisiológica), que fluidifica e facilita a manipulação da amostra e formação de sedimento após centrifugação. Porém, não foi comprovado que esse tratamento melhore a recuperação de fungos da amostra sendo, portanto, opcional. Pode-se utilizar, como alternativa, para digestão da amostra, solução de KOH 20%. A porção purulenta da amostra é preferível e porções liquefeitas não são adequadas para isolamento do agente. A porção da amostra tratada com KOH, porém, só pode ser usada para exame microscópico, pois a potassa destrói, após algumas horas, as estruturas do fungo, inviabilizando seu isolamento em meio de cultura. Nesse caso, outra porção da amostra deve ser centrifugada e o sedimento usado para cultura.
- **Tecidos** obtidos por biópsia requerem fragmentação, com o auxílio de um bisturi estéril ou maceração (gânglio) com pistilo em almofariz; pode ser feito dentro de uma placa de Petri estéril. Esse procedimento visa aumentar a área de superfície e expor o microrganismo ligado ao tecido, ao maior contato com o meio de cultura.
- **Sangue e aspirado de medula óssea** não necessitam preparação, sendo que o exame microscópico tem baixa sensibilidade e, portanto, a cultura é importante para identificação do agente. Para cultura, as amostras são semeadas imediatamente, após a coleta, em frascos contendo meio de cultura. O meio pode ser bifásico (15 ml de ágar inclinado sob 50 ml de caldo) composto de infusão de cérebro-coração (meio BHI) ou Sabouraud. Meios contendo saponina para lise e posterior centrifugação da amostra são indicados. Na prática, frascos para hemocultura bacteriológica (simples ou automatizada) proporcionam isolamento adequado de fungos, desde que respeitados os períodos necessários ao seu desenvolvimento. Para fungos dimórficos, de crescimento lento (>15 d), muitos autores consideram o método de lise-centrifugação o mais sensível. Sangue e medula óssea não devem ser coletados em seringas contendo EDTA, pois essa substância se combina com elementos da parede dos fungos, diminuindo a sensibilidade do exame. Um dos procedimentos recomendados é a inoculação de 5 a 6 ml da amostra no frasco com meio bifásico sendo uma parte para 10 partes do meio líquido, que deve ser então incubado à temperatura de 30°C.

1.3.1 Exame microscópico de amostras

Na dependência do material clínico, a observação de um fungo na amostra biológica tem grande valor diagnóstico, pois demonstra sua presença no tecido e permite uma informação imediata ao médico, a qual pode ser crucial para determinar a terapia apropriada ao paciente. No entanto, se a quantidade da amostra biológica for insuficiente para o exame microscópico e cultura do material, a cultura, na maioria das amostras, tem prioridade sobre o exame microscópico, por ser mais específico e, em muitos casos, mais sensível.

O exame microscópico da amostra é realizado por várias técnicas, dependendo do tipo da amostra e suspeita clínica.

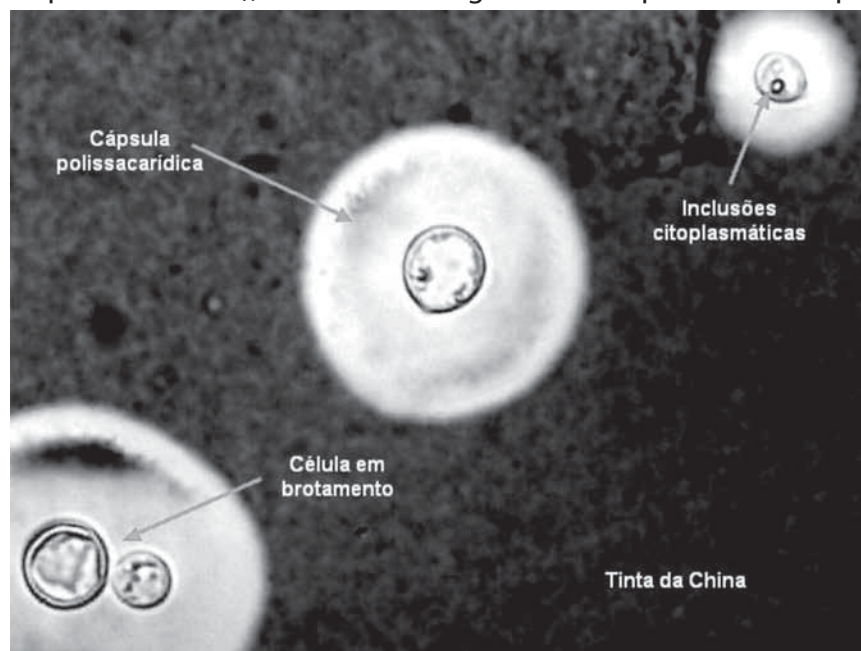
1.3.2 Exame microscópico direto com hidróxido de potássio (KOH) a 20%

Técnica utilizada para exame de pelos, pele, unha, tecido obtido por biópsia, exsudatos espessos e outros materiais densos. Colocar uma gota de KOH (aquoso a 20%) em uma lâmina de microscopia e sobre essa uma porção da amostra a ser examinada. Cobrir a preparação com uma lamínula e, para intensificar a clarificação, aquecer ligeiramente, sobre a chama de um bico de Bunsen, sem deixar ferver a mistura. Examinar a preparação após 20 minutos, em microscópio óptico comum, inicialmente, com objetiva de 10x, seguida de 40x.

1.3.3 Exame microscópico direto com tinta nanquim (tinta da China)

Utilizado em amostras de líquido, urina, secreções ou exsudatos, para visualização de leveduras capsuladas do gênero *Cryptococcus*, que se tornam mais evidentes contra o fundo negro proporcionado pela tinta. Colocar uma gota de tinta nanquim e uma gota do sedimento da amostra centrifugada sobre uma lâmina. Cobrir a preparação com lamínula e observar ao microscópio óptico (objetivas de 10x e 40 x). Nessa técnica, um erro bastante frequente é confundir linfócitos com células de leveduras. A diferenciação é feita pela refringência da parede celular e das inclusões no citoplasma das leveduras, além da presença de brotamentos (Figura 2).

Figura 2 *Cryptococcus sp*: leveduras em brotamento rodeadas de halo transparente (cápsula polissacarídica), sobre fundo negro formado pela tinta nanquim



1.3.4 Exame microscópico com coloração pelo método de Gram

Todos os fungos são Gram-positivos, assim a utilização da coloração não visa a diferenciação dos microrganismos, mas possibilita discriminar elementos fúngicos de artefatos existentes em urina, secreções e fezes. A amostra é espalhada de modo homogêneo, em movimentos circulares, em uma lâmina de microscopia, fixada com calor e submetida à coloração.

1.3.5 Exame microscópico com coloração panótica (Giemsa, Leishman ou Wright)

Essas colorações são usadas para pesquisa de *Histoplasma capsulatum* em diversas amostras biológicas: medula óssea, sangue, aspirados e secreção cutânea. Nesses casos, faz-se um esfregaço semelhante ao usado para coloração de Gram. Fixa-se com metanol e cora-se segundo o método escolhido. Podem ser usadas ainda para corar “imprints” de tecidos obtidos por biópsia.

A seguir estão esquematizados os principais aspectos morfológicos observados ao exame microscópico e os possíveis agentes etiológicos de acordo com a amostra biológica.

Quadro 3 Interpretação de aspectos morfológicos encontrados em exames microscópicos de amostras biológicas

Amostra Biológica	Aspecto Morfológico	Interpretação
Pelos	a. Hifas hialinas e/ou artrosporos ⁽¹⁾	a. Dermatófitos
Unhas, escamas de pele	a. Hifas regulares, septadas, ramificadas, hialinas, artrosporadas ⁽¹⁾	a. Dermatófitos
	b. Leveduras e pseudo-hifas	b. <i>Candida</i> spp
	c. Grupo de leveduras e/ou pequenas hifas tortuosas, hialinas ⁽¹⁾	c. <i>Malassezia</i> sp
Líquor	a. Levedura capsulada ⁽²⁾	a. <i>Cryptococcus</i> sp
Secreção vaginal	a. Levedura e pseudo-hifa ^(1,3)	a. <i>Candida</i> spp
Secreções (trato respiratório, nasal, oral, naso-faringe)	a. Hifas ramificadas, hialinas, septadas ⁽³⁾	a. Fungos filamentosos hialinos ⁽⁵⁾
	b. Levedura capsulada ⁽²⁾	b. <i>Cryptococcus</i> sp
	c. Levedura e pseudo-hifa ^(1,3)	c. <i>Candida</i> spp
	d. Leveduras globosas ou multiformes, de parede espessa, inclusões citoplasmáticas, com múltiplos brotamentos ⁽¹⁾	d. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
Tecidos, pus e aspirados (subcutâneo, ganglionar, cerebral, pulmonar, mucosa ou outro)	a. Hifas irregulares, largas, cenocíticas ^(1,3)	a. Zigomicetos
	b. Hifas ramificadas, hialinas, septadas ^(1,3)	b. Fungos filamentosos hialinos ⁽⁵⁾
	c. Hifas septadas de cor castanha ou marrom ^(1,3)	c. Feohifomicetos (fungos demácios)
	d. Estruturas ovaladas, com ou sem septos, de cor castanha (estruturas muriformes) ⁽¹⁾	d. Cromomicetos (agentes de cromomicose)
	e. Levedura e pseudohifa ^(1,2)	e. <i>Candida</i> spp
	f. Levedura capsulada ⁽²⁾	f. <i>Cryptococcus</i> sp
	g. Levedura globosa ou ovóide, de parede espessa, inclusões citoplasmáticas, com brotamento único ou múltiplos ⁽¹⁾	g. <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
	h. Leveduras pequenas, tipo charuto (achado muito raro) ⁽³⁾	h. <i>Sporothrix schenckii</i>
	i. Leveduras pequenas em macrófagos ⁽⁴⁾	i. <i>Histoplasma capsulatum</i>

Amostra Biológica	Aspecto Morfológico	Interpretação
Fluídos oculares	a. Fragmentos de hifas, hialinas, septadas ^(1,3)	a. Fungos filamentosos hialinos ⁽⁵⁾
	b. Leveduras e pseudohifas ^(1,3)	b. <i>Candida</i> spp
Sangue e medula óssea	a. Fragmentos de hifas ramificadas, hialinas, septadas ^(3,4)	a. Fungos filamentosos ⁽⁵⁾
	b. Levedura capsulada ⁽²⁾	b. <i>Cryptococcus</i> sp
	c. Leveduras em brotamento ^(3,4)	c. Leveduras ⁽⁶⁾
	d. Leveduras pequenas em macrófagos ⁽⁴⁾	d. <i>Histoplasma capsulatum</i>

(1) Exame microscópico com KOH

(2) Exame microscópico com tinta nanquim

(3) Exame microscópico com coloração de Gram

(4) Exame microscópico com coloração de Giemsa ou panótica

(5) São fungos saprófitas que podem se tornar oportunistas, por exemplo *Aspergillus*, *Fusarium*, *Acremonium*, cuja identificação só é possível pela cultura.

(6) No sangue, leveduras do gênero *Candida* não formam pseudohifas e a identificação de gênero e espécie é possível somente, após isolamento em meio de cultura.

1.3.6 Cultura de amostras biológicas para isolamento de fungos

A amostra, após o processamento, poderá ser usada para isolamento do agente etiológico. Para tanto, deverá ser semeada em movimentos de estrias (zig-zague) sobre a superfície de meios sólidos de cultura, distribuídos em tubos de ensaio, tamponados com tampão hidrófilo.

1.3.7 Meios de cultura

O meio de cultura pode ser selecionado segundo tipo de amostra e agente etiológico, conforme a suspeita clínica. De acordo com os aspectos observados ao exame microscópico da amostra, pode-se ainda redirecionar o procedimento para isolamento do agente. Recomenda-se sempre 2 tubos de meio para semeadura da amostra biológica, os quais deverão ser incubados à temperatura de 30°C, usada atualmente para todos os tipos de amostras. Quando a hipótese diagnóstica apontar para um fungo dimórfico, incubar um dos tubos a 35° C.

Para isolamento de fungos a partir de qualquer tipo de amostra, devem ser utilizados meios não seletivos, que permitam crescimento de fungos patogênicos e bolores de crescimento rápido (< de 7 dias). Esses fungos, apesar de serem contaminantes de meio ambiente, podem ser agentes de micoses em pacientes suscetíveis, ou seja, são potencialmente oportunistas.

O meio básico em laboratório de micologia é o ágar Sabouraud dextrose (ASD), chamado simplesmente, ágar Sabouraud. O ASD é o meio mais utilizado, por ser relativamente barato e permitir o crescimento de todos os fun-

gos, com raríssimas exceções. Em regra, usa-se um antibiótico para impedir o crescimento de bactérias que poderiam prejudicar o isolamento de fungos. O cloranfenicol é o mais indicado, pois resiste à autoclavação. Pode ser colocado tanto no ASD como em outros meios de cultura para fungos.

Meios ditos seletivos para fungos patogênicos contêm cicloheximida que inibe parcialmente, ou totalmente, fungos anemófilos. Esses meios são indicados para cultivo de materiais coletados de lesões com suspeita de dermatofitose, para aumentar a sensibilidade no isolamento de dermatófitos. Deve-se ressaltar que essa substância poderá inibir o isolamento de fungos oportunistas, como *Aspergillus sp*, além de *Histoplasma capsulatum* na fase leveduriforme e certas leveduras patogênicas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*.

Existem meios presuntivos que indicam presença de certos grupos de fungos ou determinados gêneros, como por exemplo ágar contendo compostos fenólicos para *Cryptococcus sp* (ágar contendo sementes de niger ou *Guizzotia abyssinica*) ou ágar especial para dermatófitos (Dermatophyte Test Medium). Existem ainda meios presuntivos, por reação enzimática e colorimétrica, de espécies de *Candida spp* (Candida Medium, ChromAgar, Biggy Ágar, etc). São meios mais caros que ASD e, além disso, sua maior aplicação é no isolamento primário de leveduras, a partir de amostras biológicas muito contaminadas, tais como: secreção vaginal, fezes e urina. A identificação, no entanto, é feita somente após análise morfológica e fisiológica.

Para isolamento ou subcultivo de dermatófitos recomenda-se o ágar batata, encontrado no comércio, sob forma desidratada, para aumentar a esporulação e facilitar a identificação do gênero e espécie do fungo.

Para fungos dimórficos, de crescimento lento (> 15 dias), recomenda-se o uso de meios enriquecidos como o ágar infusão de cérebro-coração (BHI) para obtenção, em menor tempo, de culturas melhor desenvolvidas. Pode ser acrescido de 5 a 10% de sangue de carneiro e de antibióticos (de preferência, cloranfenicol ou penicilina e estreptomicina).

1.3.8 Procedimentos para cultura

Os materiais devidamente processados devem ser semeados na superfície dos meios de cultura, com alça de níquel-cromo ou pipeta Pasteur, com movimentos em estrias em ziguezague, para permitir separação de eventuais contaminantes da amostra. O material não deve ser colocado em profundidade no ágar, mas apenas aderido à superfície do meio. A temperatura de incubação recomendada para todas as amostras é 30°C, devido à possibilidade

de o agente etiológico ser oportunista, e desse modo, crescer melhor a 30°C do que a 37°C no primo isolamento. Além disso, pensando em Brasil, em que, as temperaturas são muito altas nas regiões Norte e Nordeste, dificilmente alcançam 25°C, a menos que se utilize estufa BOD (“body oxygen demand”). A temperatura de 30°C é verificada, mais facilmente, durante muitas horas do dia.

- Hemoculturas fazem parte da rotina diagnóstica para casos de infecção hospitalar e merecem algumas recomendações à parte para isolamento de fungos. Os frascos contendo meio bifásico e sangue ou aspirado de medula óssea devem ser submetidas à agitação manual periódica, para maior homogeneização do oxigênio na fase líquida do frasco. Exames macroscópicos diários da superfície da fase sólida são indicados para verificar aparecimento de colônias de: leveduras dos gêneros *Candida*, *Cryptococcus* e outros (24 h-7 dias), fungos filamentosos e *Sporothrix schenckii* (2 a 15 d) e fungos dimórficos, como: *Paracoccidioides brasiliensis*, *Histoplasma capsulatum* (15 a 30d). Qualquer colônia de fungo deve ser repicada em ASD, para posterior identificação.
- O crescimento de fungos, ao contrário de bactérias, não resulta em turvação imediata do meio líquido, de modo que a análise microscópica de uma gota do meio, abrevia o prazo de resultados positivos. Recomenda-se a pesquisa microscópica do crescimento de fungos corando por Gram, duas gotas do meio líquido, periodicamente, em cada um dos períodos acima citados. Além do exame microscópico da fase líquida, um procedimento que resulta em maior sensibilidade da cultura é a realização de repiques de 1 ml da fase líquida para tubos contendo ASD ou BHI em dias alternados: 2º, 10º e 30º dia.
- Visto que a maioria dos laboratórios brasileiros não trabalha com o meio bifásico, pode-se inocular a amostra, na mesma proporção de 10%, em frascos de hemocultura bacteriológica e fazer a leitura como anteriormente descrito. Entretanto, sistemas automatizados para hemoculturas, que acusam o crescimento de qualquer microrganismo em até 7 dias, não permitem identificar a presença de fungos de crescimento mais lento. Nesses casos, a incubação por período de até 30 dias, com repiques do caldo em ASD. O procedimento para sangue e aspirado de medula óssea, denominado lise-centrifugação, não é muito difundido no Brasil, pelo custo de importação do sistema. O material biológico é inoculado diretamente no frasco do sistema, que contém saponina, que lisa as células liberando assim os microrganismos intracelulares. A seguir, deve-se realizar centrifugação que direcionará os elementos fúngicos para o fundo do tubo que já contém o meio de cultura. O sobrenadante é desprezado e, dessa forma, a cultura foi realizada, evitando-se subcultivos que são ne-

cessários quando se inocula o material em meios bifásicos ou líquidos. A incubação é feita a 37°C por período de até 30 dias.

- Abaixo estão os procedimentos recomendados para exame direto e cultura, visando obter melhor rendimento no isolamento primário de fungos, de acordo com tipo de amostra biológica.

Quadro 4 Procedimentos laboratoriais para exame direto e isolamento de fungos, segundo amostra biológica

Amostra Biológica	Processamento	Exame Microscópico	Meio de Cultura*
Secreção respiratória	<ul style="list-style-type: none"> - Fluidificação recomendada - Centrifugação - Uso do sedimento 	<ul style="list-style-type: none"> - “a fresco” - KOH a 20% - Giemsa - Tinta naquim 	<ul style="list-style-type: none"> - ASD - BHI
Líquor	<ul style="list-style-type: none"> - Centrifugação - Uso do sedimento 	<ul style="list-style-type: none"> - Tinta naquim - Gram 	<ul style="list-style-type: none"> - ASD
Urina**	<ul style="list-style-type: none"> - Centrifugação - Uso do sedimento 	<ul style="list-style-type: none"> - “a fresco” - Gram 	<ul style="list-style-type: none"> - ASD
Fluidos corporais (pleural, ascítico, sinovial, pericárdico, gástrico, brônquico)	<ul style="list-style-type: none"> - Centrifugação - Uso do sedimento 	<ul style="list-style-type: none"> - KOH 20% - Giemsa 	<ul style="list-style-type: none"> - ASD - BHI
Pus e secreções de abscessos	<ul style="list-style-type: none"> - Nenhum 	<ul style="list-style-type: none"> - KOH 20% - Giemsa 	<ul style="list-style-type: none"> - ASD - BHI
“Swab” embebido em salina (mucosa oral, nasal, vaginal, anal, olhos, conduto auditivo)	<ul style="list-style-type: none"> - Centrifugação - Uso do sedimento 	<ul style="list-style-type: none"> - Gram 	<ul style="list-style-type: none"> - ASD
Pele, pelos e escamas de unhas	<ul style="list-style-type: none"> - Nenhum 	<ul style="list-style-type: none"> - KOH 20% 	<ul style="list-style-type: none"> - ASD
Tecidos e peças	<ul style="list-style-type: none"> - Fragmentação ou maceração - “Imprint” em lâmina 	<ul style="list-style-type: none"> - KOH a 20% - Giemsa - Tinta naquim 	<ul style="list-style-type: none"> - ASD - BHI
Sangue e medula óssea	<ul style="list-style-type: none"> - Semeadura em meio de cultura - Esfregaço ou distensão em lâmina 	<ul style="list-style-type: none"> - Giemsa 	<ul style="list-style-type: none"> - BHI bifásico ou líquido - ASD bifásico ou líquido

* Todos os meios sólidos para isolamento de fungos devem conter cloranfenicol.

** Para contagem de colônias (UFC/ml), semear 0,1 ml de urina em ASD distribuído em placa de Petri, antes de centrifugar.

1.4 Identificação de fungos

O isolamento de um fungo em meio de cultura não significa, necessariamente, que ele é o agente etiológico da infecção. A presença de fungos na microbiota (flora) de pacientes, por exemplo *Candida sp*, e no meio ambiente, por exemplo *Aspergillus sp*, pode resultar em cultura positiva. Isso explica o grande número de culturas positivas para fungos a partir de uma amostra biológica. A relação entre o fungo isolado em meio de cultura e sinais e sintomas é critério clínico-epidemiológico. No entanto, deve-se sempre valorizar o isolamento de um fungo procedente de:

- Qualquer amostra biológica que mostrou resultado positivo ao exame microscópico.
- Micose cutânea.
- Fluídos corporais normalmente estéreis.
- Tecidos obtidos por biópsias ou peças operatórias.
- Urina, obtida por sondagem ou cistoscopia, independentemente da contagem de colônias.
- Raspado de córnea.
- Paciente imunossuprimido (transplantado ou com Aids).
- Paciente em uso de antibióticos por longo tempo, internado em unidade de terapia intensiva ou submetido a ventilação mecânica, cateterismo ou outra manipulação.
- Paciente de hemodiálise ou debilitado que apresente algum sintoma ou sinal de doença infecciosa independentemente do tipo de amostra clínica.

Além desses casos, têm importância as culturas de fungos:

- Dimórficos.
- Fungos isolados mais de uma vez do mesmo tipo de amostra biológica coletada em diferentes dias e procedentes do mesmo paciente.
- Isolados de ponta de cateter (alimentação parenteral, infusões venosas, etc.).

O profissional de laboratório deve tentar identificar todas as culturas positivas relevantes e emitir o resultado mais acurado possível. Muitas vezes, o exame microscópico direto da cultura é suficiente para direcionar as medidas de controle da infecção, outras vezes somente a identificação do fungo pode orientar adequadamente a conduta clínica.

A identificação dos fungos, de modo ideal, deve contemplar o gênero e a espécie; porém, muitas vezes, em especial para os fungos filamentosos, isso não é possível pelo grau de dificuldade e complexidade desses microrganismos. Nesses casos, a identi-

ficação do grupo de fungos pode ser suficiente para o diagnóstico da micose, por exemplo, zigomicetos, feo-hifomicetos, dermatófitos, leveduras, etc.

1.4.1 Identificação de leveduras (morfológica e bioquímica)

A macromorfologia das leveduras, em especial as do gênero *Candida*, não apresenta muita diversidade e, portanto, nem sempre é um parâmetro suficiente para sua identificação.

Colônias de levedura obtidas de amostra biológica só devem ser identificadas quando estiverem puras, ou seja, sem contaminação bacteriana ou em mistura de espécies. Para tanto, deve ser realizado o plaqueamento de cada colônia morfolologicamente distinta e confirmada sua pureza, por microscopia. De cada colônia deve ser feito um repique em ASD para sua identificação. Para isolamento e identificação presuntiva ao mesmo tempo de algumas espécies de *Candida* mais frequentes, está disponível no mercado o meio comercial Chromagar Candida®.

A pesquisa de cápsula, característica marcante do gênero *Cryptococcus*, é feita com uma gota de tinta nanquim e uma alçada da cultura. A cápsula, constituída de material polissacarídico, aparece como um halo claro ao redor dos blastoconídios de *Cryptococcus* e contrastam com o fundo negro da lâmina.

As provas fisiológicas mais comuns e mais simples para identificação de *Candida albicans* e *Candida* sp são: tubo germinativo e filamentação em cultivo em lâmina.

No cultivo em lâmina, avalia-se a capacidade de produção de hifas/pseudo-hifas. Desse modo, a presença de hifas hialinas, ramificadas e sem fragmentação, é sugestiva do gênero *Candida* sp e se, além disso, desenvolver clamidósporos (células de reserva), em adição ao tubo germinativo positivo, é identificada como *Candida albicans*. A presença de hifas hialinas ramificadas que podem se fragmentar em esporos, denominados artroconídios, indica espécies dos gêneros *Geotrichum* e *Trichosporon*. Assim, gêneros tais como *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* e *Trichosporon* também podem, na maioria das vezes, serem identificados apenas por sua morfologia característica.

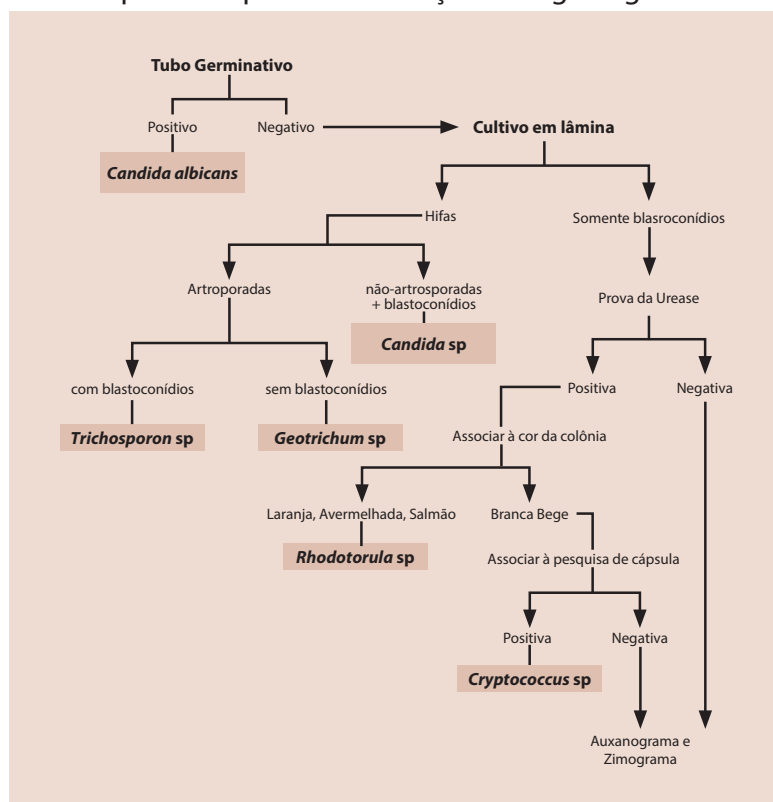
O restante dos gêneros e a classificação em espécies, porém, necessita de provas bioquímicas para sua identificação. No entanto, do ponto de vista clínico, nem sempre é importante a identificação acurada da levedura. Por outro lado, a simples identificação de *C.krusei*, intrinsecamente resistente a fluconazol, é extremamente importante.

A prova de urease, disponível em todo laboratório de microbiologia, é muito utilizada em micologia. A reação positiva para urease, junto com a análise morfológica, permite identificação presuntiva de *Cryptococcus* sp. Leveduras do gênero *Rhodotorula* são também urease positiva, mas, como normalmente, apresentam colônias com pigmento avermelhado ou salmão, são distinguidas de *Cryptococcus* sp.

A identificação também pode ter interesse epidemiológico. Para leveduras relacionadas a episódios de infecção hospitalar, por exemplo, há grande preocupação no estudo das espécies dos agentes, como marcador epidemiológico temporal e espacial de infecções, como no caso de espécies de *Candida* que têm menor sensibilidade a antifúngicos azólicos.

O esquema a seguir propõe um fluxo para identificação das principais leveduras de interesse médico.

Figura 3 Esquema simplificado para identificação de alguns gêneros de leveduras



Se as provas não conduzirem à identificação presuntiva do gênero, provas de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio (auxanograma) e fermentação de carboidratos (zimograma) devem ser realizadas e interpretadas segundo tabelas existentes na bibliografia recomendada ao final deste capítulo. Um exemplo simplificado é o Quadro 5.

Quadro 5 Identificação das principais leveduras de interesse médico

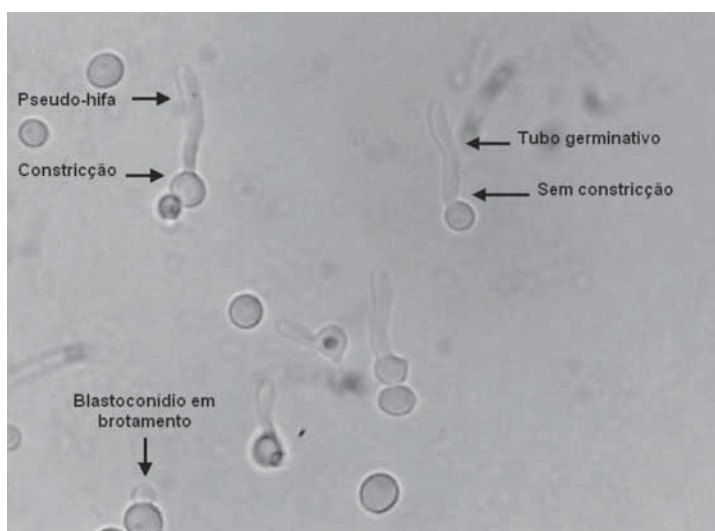
Levedura	Tg	Cultivo em lâmina		Ur	Assimilação										Fermentação					
		Hifa	Ar		Sa	Ma	La	Ce	Tr	Ra	X	I	NO ₂	Gl	Sa	Ma	La	Ra	Tr	
<i>C. albicans</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	V	
<i>C. tropicalis</i>	-	+	-	-	+	+	V	V	+	+	-	-	+	+	V	+	+	-	+	
<i>C. parapsifosis</i>	-	+	-	-	+	+	V	V	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	V	
<i>C. krusei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
<i>C. guilliermondii</i>	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	V	
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
<i>C. neoformans</i>	-	-	-	+	+	+	V	V	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Geotrichum</i>	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	V	-	-	-	-	
<i>Trichosporon</i>	-	+	+	V	+	+	+	+	V	+	V	-	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Rhodotorula sp</i>	-	-	-	+	+	V	V	V	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	
<i>Saccharomyces</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	V	+	+	-	-	+	+	+	-	+	V	

Tg = tubo germinativo, Ar = artrosporo, UR = urease, Sa = sacarose, Ma = matose, La = lactose, Ce = celubiose, T = trealose, Ra = rafinose, X = xifose, I = inositol, NO₂ = nitrato, Gl = glicose, + = pos, - = neg, V= variável

1.4.2 Prova do tubo germinativo

A partir de uma alçada da colônia isolada, fazer uma suspensão em tubo de ensaio contendo 0,5 ml de soro humano (pode-se usar também soro estéril de bovino, cavalo ou coelho). Incubar a 37°C durante período máximo de 3 horas. Esse prazo é importante porque, após esse período, outras espécies de *Candida* e de outros gêneros formam também tubo germinativo. Depositar então uma gota da suspensão sobre lâmina, cobrir com lamínula e examinar ao microscópio óptico. A presença de tubo germinativo, na forma de pequeno filamento que brota do blastoconídio, sem formar constrição com a célula-mãe, permite a identificação presuntiva de *Candida albicans* (Figura 4).

Figura 4 Prova do tubo germinativo com blastoconídios, tubo germinativo e pseudohifas de *Candida albicans*

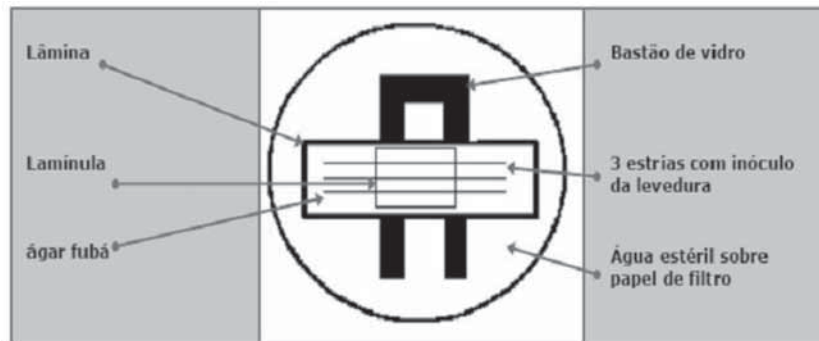


1.4.3 Cultivo em lâmina para prova de filamentação e produção de clamidósporo

Depositar 3 ml de ágar-fubá fundido sobre uma lâmina contida sobre um suporte dentro de uma placa de Petri. O suporte para a lâmina pode ser um bastão de vidro, outra lâmina ou apenas dois palitos de madeira. Após solidificação do meio, semear a levedura, com auxílio de uma agulha em “L”, fazendo 2 estrias paralelas. Recobrir as estrias com lamínula esterilizada. Fazer uma câmara úmida, acrescentando 2 ml de água destilada estéril na placa, ou embebendo um algodão estéril, para evitar dessecação do meio, durante o período de incubação da prova. Tampar a placa e após 24 horas, 48 horas e 72 horas examinar a preparação em microscópio óptico. A presença de hifas hialinas, septadas e ramificadas caracteriza o gênero *Candida* e se houver formação de clamidósporos indica *Candida albicans*. Formação exclusiva de artrósporos permite identificação de *Geotrichum*, mas quando são forma-

dos também blastoconídios trata-se de *Trichosporon*. O meio de ágar fubá ou farinha de milho pode ser adquirido no comércio (CornMeal ágar) mas sua formulação é simples, ressaltando-se que de todos as maneiras deve-se acrescentar a substância tensoativa tween 80, para que a prova dê resultados confiáveis.

Figura 5 Cultivo em lâmina para prova de filamentação e clamidósporo



1.4.4 Prova da urease

- Semear uma alçada da levedura na superfície do meio de urease (ágar uréia de Christensen).
- Incubar a temperatura de 37°C.

A mudança da cor do meio para rosa bispo em 24 horas indica reação positiva.

1.4.5 Prova de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio ou auxanograma

Nessa prova são usados 2 meios, que podem ser adquiridos no comércio na forma desidratada (Yeast Nitrogen Base e Yeast Carbon Base) ou formulados. A levedura é semeada “pour plate”, homogeneizando-se 2 ml de uma suspensão das colônias a cada meio fundido ou semeada na superfície de cada um dos meios previamente distribuídos em 2 placas de Petri. São então adicionadas pequenas alíquotas de diferentes carboidratos que servem de fonte de carbono sobre a superfície do meio isento de carbono. Várias substâncias, incluindo álcoois, proteínas e aminoácidos servem de fontes de nitrogênio e são colocadas sobre a superfície do meio isento de nitrogênio. Após incubação à temperatura ambiente ou 25°C, por período de uma semana, a levedura irá assimilar e crescer em volta de determinadas fontes, de acordo com o metabolismo característico de sua espécie. A leitura é feita pelo halo de turvação resultante do crescimento e indica prova de assimilação positiva para a respectiva fonte. Os resultados são comparados a tabelas existentes na bibliografia recomendada (exemplo simplificado consta no Quadro 5).

1.4.6 Fermentação de açúcares ou zimograma

A capacidade de fermentar carboidratos, ao lado do auxanograma, irá completar o perfil bioquímico da levedura permitindo a identificação acurada de gênero e espécie (Quadro 5). As características morfológicas são fundamentais para concluir a identificação, desde que diversas espécies têm perfis bioquímicos idênticos, mas morfologias distintas. Para o zimograma, diversas fontes de carboidratos são colocadas em tubos respectivos contendo meio básico líquido. A levedura é semeada em cada tubo e, após um período de até 15 dias a 25°C, a fermentação é revelada por formação de bolhas de gás, observadas dentro de tubos de Durham, colocados previamente durante a preparação do meio básico.

1.4.7 Métodos comerciais para identificação de leveduras

Em se tratando de espécies de *Candida*, o mercado já dispõe de Kits manuais como API 20C AUX (BioMerieux), ID 32C (BioMerieux), Candifast (International Microbio) e metodologia semiautomatizada, como os cartões de identificação de fungos Vitek (BioMerieux).

1.4.8 Identificação de fungos filamentosos

Os fungos filamentosos, patogênicos ou contaminantes ambientais, potencialmente oportunistas, formam um grupo muito extenso impossível de ser tratado neste Manual. Para identificação das diversas espécies ou grupos existe bibliografia especializada de textos, manuais e atlas, indicados no final do capítulo. Dentro do objetivo deste Manual serão ilustrados apenas aspectos macroscópicos e microscópicos de alguns fungos de interesse médico, isolados com maior frequência no Brasil.

A identificação de fungos filamentosos tem, como fundamento, a observação da morfologia da colônia e aspectos microscópicos. A análise da colônia visa observar: cor, textura, superfície, pigmento difusível no meio de cultura, entre outros, e pode ser feita no tubo de ensaio contendo a cultura primária do fungo. Porém, o mais adequado é a análise a partir da “colônia gigante”, ou seja, uma cultura feita no ponto central de uma camada de ágar Sabouraud Dextrose ou ágar batata distribuído em placa de Petri. A velocidade de crescimento que pode ser rápida (< 7 dias), intermediária (8 a 14 dias) ou lenta (> 15 dias) é fundamental para identificação presuntiva do fungo.

A observação das estruturas microscópicas, tais como: hifa hialina ou demácia, septada ou cenocítica, forma, disposição e formação dos esporos são suficientes, em geral, para a identificação dos gêneros, mas nem sempre para a caracterização das espécies de fungos filamentosos. Em alguns grupos,

como o dos fungos demácios, pode ser necessário também uso de provas bioquímicas.

A morfologia microscópica é mais bem visualizada com a técnica de microcultivo que preserva a disposição original dos esporos sobre as hifas e mantém íntegras certas estruturas formadoras de esporos, por exemplo: os esporângios que são órgãos de reprodução de zigomicetos.

1.4.9 Técnica de microcultivo para fungos filamentosos

Colocar sobre uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri esteril, um cubo de ágar: ASD ou ágar batata. A lâmina deve estar sobre um suporte, que pode ser formado por outra lâmina, ou um pequeno bastão de vidro recurvado, ou ainda, dois palitos de fósforo. Semear o fungo, a partir de repique recente, nos 4 lados do cubo de ágar. Recobrir com uma lamínula esterilizada. Fazer uma câmara úmida, adicionando 1 a 2 ml de água destilada esteril no fundo da placa ou embeber um pequeno chumaço de algodão esteril, para evitar a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo. Tampar a placa e deixar à temperatura ambiente por 7 a 10 dias, até que se observe desenvolvimento de hifas com ou sem pigmentação (Figura 6).

Após esse período inativar a esporulação, adicionando 1 ml de formol ao algodão e vedando a placa com fita adesiva durante 24 horas - 48 horas. O vapor de formol, além de inativar o fungo, irá auxiliar na fixação das estruturas microscópicas. Retirar a lamínula com auxílio de uma pinça, cuidadosamente, uma vez que nela deverão estar aderidas as hifas e esporos do fungo. Pingar uma gota de corante azul de lactofenol-algodão ("Cotton Blue") e montar sobre uma lâmina. Desprezar o cubo de ágar e, em seu lugar, pingar outra gota de corante lactofenol-azul algodão e recobrir com lamínula, para visualizar esporos e hifas também aderidos à lâmina. Observar em microscópio ótico com objetiva de 40 X, o tipo e cor da hifa, forma, disposição e formação de esporos.

Figura 6 Técnica de microcultivo para análise microscópica de fungos filamentosos

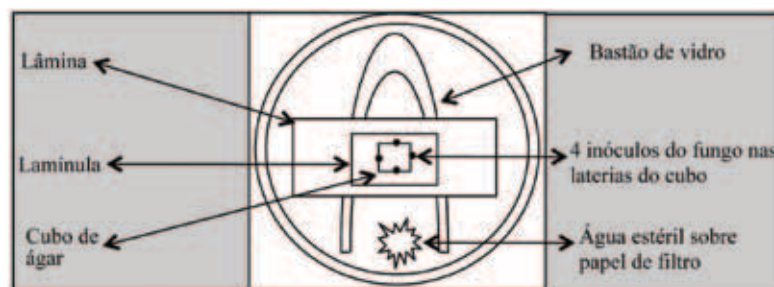
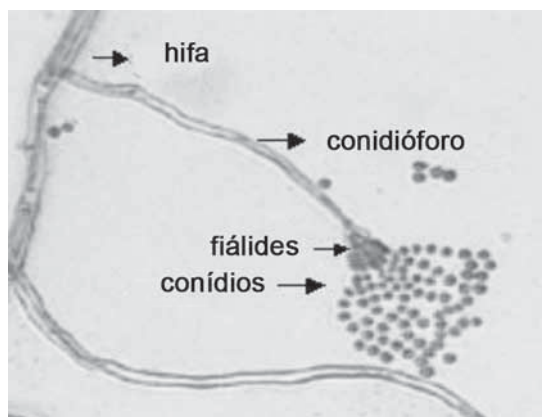


Figura 7 Estrutura geral de um fungo filamentosso



1.4.10 Identificação de fungos dimórficos

Dimórficos são fungos filamentosos que podem, sob determinadas condições, assumir forma de levedura, diminuindo a capacidade de filamentação e dividindo-se por brotamento, conferindo às colônias aspecto cremoso. Essa fase leveduriforme ocorre sob temperatura acima de 30°C, de preferência a 37°C. São fungos de crescimento lento (>15 dias) no primo-isolamento (*Histoplasma capsulatum* e *Paracoccidioides brasiliensis*) ou moderado (8 a 14 dias), como *Sporothrix schenckii*. A identificação é feita pela comprovação do dimorfismo e pelo aspecto microscópico característico de cada fase.

1.5 Descrição das principais micoses observadas no Brasil

1.5.1 Micoses superficiais

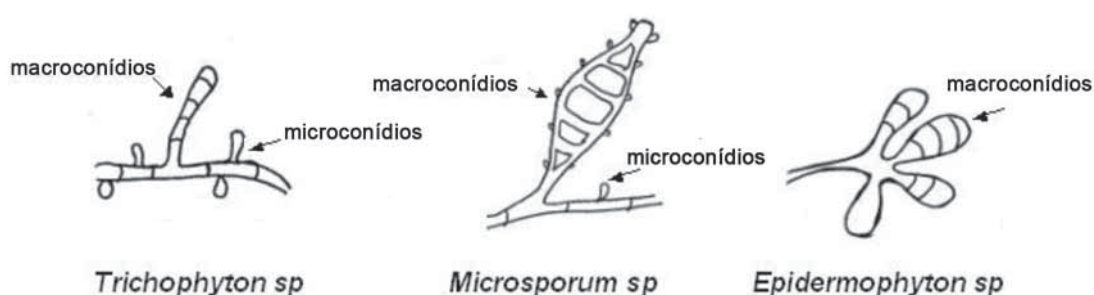
Dermatofitoses (tineas)

São infecções fúngicas limitadas às camadas superficiais queratinizadas da pele, pelos e unhas, popularmente conhecida como “epinge” ou “frieira”, dependendo da localização das lesões que são extremamente pruriginosas. Em imunodeprimidos podem acometer tecidos subcutâneos.

- **Agentes etiológicos:** *Microsporum spp*, *Trichophyton spp* e *Epidermophyton floccosum*
- **Ocorrência:** universal, acometendo indivíduos de qualquer idade, sexo ou raça.
- **Fontes de infecção:** contágio direto com animais, solo ou indivíduo infectado.
- **Procedimento laboratorial:**
 - Amostra: escamas de pele, unha e cabelos.

- Exame da amostra com KOH a 20% revela hifas regulares, hialinas, septadas, refringentes, frequentemente artrosporadas.
- Cultura: material deve ser semeado em ASD, com auxílio de uma alça em "L", de forma a ficar em perfeito contato com o meio de cultura. As colônias de dermatófitos geralmente crescem a partir do 10º dia de incubação à temperatura ambiente e os fungos são identificados pela sua morfologia macroscópica e microscópica. No Brasil, os dermatófitos mais frequentes são *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* e *M. canis*.

Figura 8 Características microscópicas dos gêneros de dermatófitos



1.5.2 Micoses subcutâneas e profundas

Esporotricose

Infecção crônica cuja forma clínica mais frequente em nosso meio é a forma linfangítica nodular ascendente. Atinge, em geral, uma das extremidades sob forma de lesão ulcerada no ponto de inoculação e acomete a drenagem linfática regional com formação de gomas no trajeto. As formas disseminadas são raras em pacientes imunocompetentes, mas frequentes em pacientes com Aids.

- **Agente etiológico:** *Sporothrix schenckii*
- **Ocorrência:** doença de distribuição universal que acomete principalmente trabalhadores rurais e floristas.
- **Procedimento laboratorial:**
 - Amostra: aspirado das lesões gomosas ou tecido subcutâneo.
 - Exame microscópico da amostra apresenta baixa sensibilidade, mas exame de cortes de tecido corados pode revelar leveduras em forma de "charuto" ou apenas formas ovaladas com divisão em brotamento (blastosporos).
 - Cultura: fungo dimórfico que se desenvolve bem em ASD entre 7 a 12 dias e cuja forma filamentosa (< 30°C) apresenta hifas hialinas finas e septadas com esporos dispostos em arranjo semelhante à flor "margarida". A forma leveduriforme (> 30°C) não é característica do gênero.

ro e requer meios ricos acrescidos de sangue, cisteína e submetidos à tensão de CO₂. O interesse na obtenção da fase leveduriforme é para diferenciar o agente da esporotricose do gênero *Sporothrix*, fungo filamentoso não-dimórfico e anemófilo de meio ambiente. A forma filamentosa apresenta na microscopia a forma adequada para identificação do agente.

Figura 9 Microscopia em cultura de *Sporothrix schenckii* cultivado à temperatura ambiente (A) e a 37°C (B)



Paracoccidioidomycose

Doença granulomatosa crônica que pode acometer pele, mucosas, linfonodos, sistema respiratório, trato gastrointestinal, adrenais, fígado, baço e SNC. Apresenta grande variabilidade de manifestações clínicas, desde formas localizadas até formas disseminadas de mau prognóstico, na dependência da resposta imune do hospedeiro. Existe também a paracoccidioidomycose-infecção, em que o indivíduo não apresenta sinais e sintomas mas demonstra por testes intradérmicos positivos que entrou anteriormente em contato com o fungo. Apresenta muitas semelhanças com a tuberculose.

- **Agente etiológico:** Complexo *Paracoccidioides* (*P.brasiliensis* e *P.lutzii*)
- **Ocorrência:** países da América Latina, principalmente Brasil.
- **Procedimento laboratorial:**
 - Amostra: raspado de lesão e mucosa, secreção do trato respiratório, aspirado de linfonodos, tecido obtido por biópsia.
 - Exame direto com KOH a 20% revela a presença da forma leveduriforme constituída de células grandes (10µm a 60 µm), globosas, com parede celular dupla e refringente e com múltiplos brotamentos, à semelhança de “roda de leme”, orelhas de “Mickey Mouse” ou argolas entrelaçadas.
 - Cultura: fungo dimórfico de crescimento lento (> 15 dias). Culturas desenvolvidas a < 30°C são filamentosas, de cor branca, cotonosa, com

sulcos centrais, composta de hifas hialinas finas, septadas e fragmentadas em esporos multiformes. As colônias incubadas entre 30°C a 35°C são de cor creme, pregueadas e enrugadas, cuja microscopia revela as formas características leveduriformes que permitem a identificação do agente.

Figura 10 Microscopia em cultura de *Paracoccidioides* spp cultivado à temperatura ambiente (A) e a 37°C (B)



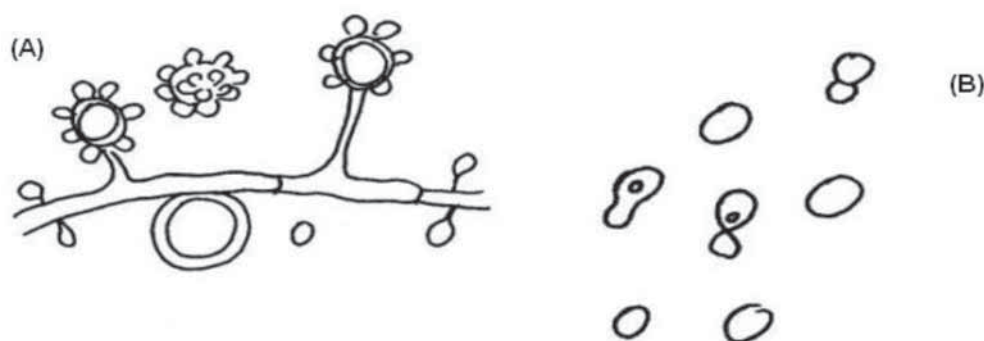
Histoplasmose

Doença que acomete primariamente o sistema retículo-endotelial. A infecção pode ser localizada ou generalizada. A histoplasmose primária afeta o sistema respiratório e a histoplasmose progressiva atinge fígado, baço, linfonodos, mucosas, medula óssea, etc. Em indivíduos hígidos, a infecção tem bom prognóstico, porém atualmente é importante infecção oportunista associada a Aids, nos quais ocorre a forma grave e disseminada.

- **Agente etiológico:** *Histoplasma capsulatum*
- **Ocorrência:** distribuição universal, principalmente em países de clima temperado.
- **Fontes de infecção:** inalação de esporos presentes em aerossóis formados por solos contaminados com excretas de galinhas e morcegos.
- **Procedimento laboratorial:**
 - Amostra: secreção do trato respiratório, sangue, punção de medula óssea, tecido obtido por biópsia de mucosas e outros.
 - Exame microscópico direto, sem coloração, requer muita habilidade do técnico. Recomenda-se coloração por Giemsa para melhor visualização do agente em de cortes histológicos, onde se evidencia, sob imersão, pequenas leveduras (2-5 µm) intracelulares, dentro de células mononucleares.
 - Cultura: fungo dimórfico de crescimento lento (15 a 30 dias) sendo que no primo-isolamento é mais fácil obter a forma filamentosa de cor branca, aspecto cotonoso e sulcado, à temperatura < 30°C. A confir-

mação do dimorfismo é feita através de repique em meio rico (BHI) e incubação entre 30°C e 35°C. A transformação da forma filamentosa ou miceliana à fase leveduriforme é vista com a formação de pequenas (2-5 µm) leveduras em brotamento. A identificação, porém, é feita pela micromorfologia da forma filamentosa, com a observação de esporos grandes macroconídios arredondados e com inúmeras espículas ou granulações na parede celular, chamados hipnósporos ou esporos tuberculados.

Figura 11 Microscopia em cultura de *Histoplasma capsulatum* cultivado à temperatura ambiente (A) e a 37°C (B)



1.5.3 Micoses oportunistas

Candidíase

Candidíase é uma doença com manifestações clínicas variadas. As infecções aguda e crônica mostram lesões na boca, faringe, pele, unhas, sistema broncopulmonar, intestinal e perianal. Ocasionalmente, endocardite, meningite, fungemia ou infecções em outras localizações podem ser observadas.

- **Agentes etiológicos:** *Candida albicans* e outras espécies, que estão frequentemente envolvidas em casos de micoses oportunistas em pacientes debilitados. São os principais agentes etiológicos de infecções hospitalares. As espécies de *Candida* podem ser isoladas de vários locais do corpo humano, como microbiota normal de cavidade oral, mucosa vaginal, região perianal e trato gastrointestinal.
- **Ocorrência:** universal, incluindo as formas graves que ocorrem sob fatores predisponentes para desenvolvimento da doença, tais como: desnutrição, obesidade, diabetes, gravidez, antibioticoterapia, quimioterapia e uso de corticosteróides, manipulação endovenosa inadequada, neoplasias e outras doenças debilitantes.

■ **Procedimento laboratorial:**

- Amostra: (dependerá da sintomatologia clínica) fragmentos de pele e unhas; raspados da mucosa oral, vaginal ou anal; secreção do trato respiratório, sangue, líquido, urina e fezes.
- Exame de fragmentos de pele e unhas devem ser feitos com solução de KOH 20%. Secreção do trato respiratório ou material de mucosa podem ser examinados pela coloração de Gram. A levedura aparece como células arredondadas, com brotamentos com ou sem hifas. Pequenas células podem ter diâmetro de 2-6µm, mas formas maiores são também observadas.
- Cultura: o crescimento é rápido (24-72 horas) entre 25°C e 37°C. O aparecimento ocorre em torno de 3 a 4 dias, com formação de colônias com coloração branca à bege.

Criptococose

A criptococose é uma infecção subaguda ou crônica que envolve primariamente os pulmões, com tropismo pelo sistema nervoso central (meninges), podendo atingir pele e outros tecidos.

■ **Agente etiológico:** *Cryptococcus neoformans*

■ **Ocorrência:** no homem, a distribuição da doença é universal.

■ **Procedimento laboratorial:**

- Amostra: líquido, secreção do trato respiratório ou de lesão de pele, aspirado de formação tumoral subcutânea e tecidos obtidos por biópsia. O exame laboratorial deverá incluir urina, de preferência após massagem prostática, para monitorar a presença do agente na próstata que constitui seu órgão de reserva.
- Exame obrigatoriamente com tinta nanquim para observação de células capsuladas com diâmetro variável, entre 5 µm a 20 µm, que sugere *Cryptococcus sp.*
- Cultura: secreção do trato respiratório, líquido e tecidos podem ser cultivados em ASD ou qualquer outro meio, desde que não contenham cicloheximida que inibe *Cryptococcus*. O agente cresce rápido (< 7 dias) entre 25°C e 37°C, sob forma de colônias mucóides de coloração creme à parda.
- A identificação de gênero e espécie é feita através de provas bioquímicas como teste da urease e auxanograma.

Aspergilose

A aspergilose pode se apresentar em indivíduos imunocompetentes, como lesões localizadas em unhas, pés, canal auditivo, olhos e forma bronco-pulmonar alérgica. Em pacientes imunocomprometidos, tende à forma dissemi-

nada ou cerebral, de alta letalidade, geralmente associada a neutropenia ou a doenças debilitantes.

- **Agente etiológico:** *Aspergillus fumigatus* (o mais comumente isolado)
- **Ocorrência:** tem distribuição universal. É crescente o número de relatos dessa doença como infecção secundária em pacientes em tratamento prolongado com antibiótico e corticosteróides, doenças debilitantes como carcinoma, tuberculose, pacientes neutropênicos, e em lesões de tecidos subcutâneos, da pele ou da córnea.
- **Procedimento laboratorial:**
 - Amostra: secreção do trato respiratório, material de biópsia e lavado brônquico.
 - O exame microscópico revela hifas septadas e hialinas, com 4 a 6 µm de diâmetro e que se ramificam em ângulo de até 45°.
 - Cultura: colônias de *Aspergillus fumigatus*, a espécie mais associada à doença em humanos, podem ser facilmente isoladas em ASD, em até 7 dias (crescimento rápido) com desenvolvimento, na superfície do meio, de filamentos brancos-hifas - que se tornam verde a verde-acinzentado, com a formação de esporos.

Figura 12 Micromorfologia de *Aspergillus fumigatus*



Fusariose

Hialo-hifomicose com quadros clínicos os mais variados, incluindo processos generalizados em pacientes com neoplasias. Destaca-se atualmente sua importância como agente de ceratites e onicomicoses.

- **Agentes etiológicos:** as espécies de *Fusarium* mais frequentemente relacionadas em casos de infecções humanas são *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *F. chlamydosporum* e *F. verticillioides* (*F. moniliforme*).
- **Ocorrência:** *Fusarium* spp são ubíquos e raramente causam infecção em indivíduos saudáveis, no entanto, as infecções disseminadas são, na maioria, relatadas em locais de clima quente.
- **Procedimento laboratorial:**
 - Amostra: dependente da localização da lesão, biópsia ou raspado de pele, córnea, fragmento de unha ou, em casos de suspeita de disseminação, sangue.
 - Cultura: colônia inicialmente branca e coberta por um micélio aéreo plumoso que ao maturar produz um pigmento de cor lavanda a vermelho púrpura na superfície e no reverso. Apresentam hifas hialinas, septadas, microconídios de 2 a 3 µm de diâmetro, e macroconídios com forma de “banana” ou de “foice” pela observação em microscopia óptica.

Figura 13 Micromorfologia de *Fusarium* spp



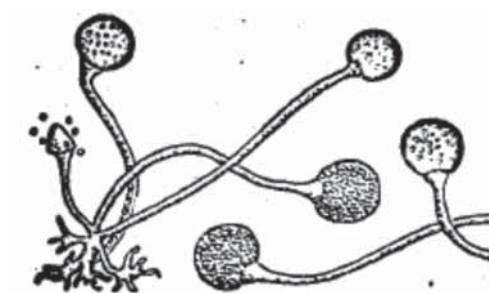
Zigomicose

Infecção geralmente subaguda de evolução rápida que acomete indivíduos debilitados, transplantados, diabéticos descompensados ou ainda com Aids. Pode acometer seios paranasais, tecido subcutâneo, pulmão e vasos sanguíneos, causando embolia no SNC e trombose. A micose em indivíduos imunodeficientes é, em geral, fatal se o diagnóstico não for rápido e o tratamento específico não for prontamente estabelecido.

- **Agentes etiológicos:** fungos da classe dos Zigomicetos, compreendendo os gêneros *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, entre outros.
- **Ocorrência:** distribuição universal.
- **Procedimento laboratorial:**
 - Amostra: secreção de sinus nasal ou tecidos obtidos por biópsia de seios paranasais ou lesões subcutâneas.

- Exame com KOH a 20% revela hifas hialinas e largas (6-50µm), cuja característica principal é a ausência de septos, que caracterizam as hifas cenocíticas desse grupo de fungos.
- Cultura: fungos de crescimento rápido (< 72 h) a 25°C em ASD, com hifas aéreas abundantes. A identificação é feita pela microscopia da colônia que evidencia hifas cenocíticas e esporos contidos dentro de estruturas fechadas denominadas esporângios.

Figura 14 Micromorfologia de *Rhizopus sp*



As localizações topográficas mais frequentes, relacionadas aos agentes fúngicos estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 Agentes etiológicos e localizações topográficas

	Dermatófitos	H. capsulatum	P. brasiliensis	S. schenckii	Aspergillus sp	Candida sp	C. neoforman	Zigomicetos
Trato respiratório		x	x		x	x	x	x
Sangue		x	x		x	x	x	x
Osso			x	x	x	x	x	
Medula óssea		x						
Pele e Unha	x					x		
Pelo	x							
Cérebro		x	x		x	x	x	x
Líquor		x				x	x	
Ouvidos					x			
Olhos					x	x		
Fígado e Baço		x	x					
Naso-faringe		x			x	x		x
Mucosas		x	x			x		
Tecidos subcutâneo e gânglios		x	x	x	x			x
Trato urinário			x			x	x	
Trato gastrointestinal			x			x		

1.6 Corantes e meios de cultura

Estão detalhados aqui apenas os corantes e meios de cultura mais utilizados na rotina diária e que podem ser preparados facilmente no laboratório. Para maiores detalhes e outros meios, recomenda-se a bibliografia no final do capítulo.

Corante Azul de lactofenol-algodão

Composição:

Ácido láctico.....	20g
Cristais de fenol.....	20g
Glicerina.....	20g
Azul algodão*	0,05g
Água destilada.....	20ml

Preparo:

- Fundir os cristais de fenol em banho-maria e juntar.
- Esperar 24 horas e filtrar.
- * O azul algodão pode ser substituído pelo azul de metileno.

Os meios de cultura utilizados para o isolamento primário de fungos a partir de amostras biológicas podem ser adquiridos no comércio, sob a forma desidratada, não precisando ser formulados no laboratório. Após a hidratação, conforme instruções do fabricante, o meio deve ser distribuído, de preferência, em tubos, pois dessa forma há maior resistência à desidratação e contaminação, além de oferecer menor bio-risco na manipulação da cultura e esterilizados por autoclavação.

Para ágar, recomenda-se a solidificação em tubo (18 x 180mm) inclinado, deixando espaço de 3 cm do final do meio até o tampão, para evitar contaminação via meio externo. O armazenamento dos tubos contendo meios de cultura deve ser em saco plástico fechado, dentro de armários, à temperatura ambiente. Desse modo, se houver uma contaminação durante o tempo de armazenamento, as colônias de fungos contaminantes serão facilmente observadas, ao contrário do que ocorre, quando se armazena sob refrigeração. O controle de esterilidade deve ser feito por 7 dias, à temperatura ambiente, antes do uso de qualquer meio de cultura.

Ágar sabouraud-dextrose (ASD)

Composição:

Dextrose	40 g
Pepton	10 g
Ágar.....	15 g
Água destilada.....	1000 ml

Preparo:

- Dissolver os componentes na água destilada.
- Acertar o pH em 5,6.
- Aquecer até a completa dissolução.
- Distribuir cerca de 10 ml por tubo.
- Esterilizar em autoclave a 120°C por 15 minutos.

Ágar sabouraud-dextrose com cloranfenicol

- Dissolver 100 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C.
- Adicionar em 1 litro de ASD antes da esterilização.

Ágar-sabouraud-dextrose com cloranfenicol e cicloheximida

(Meios comerciais mycosel, micobiotic ágar ou meio seletivo para fungos)

- Diluir separadamente 400 mg de cicloheximida (Actidione) em 10 ml de acetona.
- Diluir 50 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C.
- Misturar as soluções e adicionar em 1 litro de ASD antes da esterilização.
- pH= 7,0

Brain heart infusion ágar com cloranfenicol (bhi)

- Dissolver 50 mg de cloranfenicol em 10 ml de álcool 95°C.
- Adicionar em 1 litro de BHI preparado de acordo com as instruções do fabricante, antes da esterilização.

Ágar fubá

Composição:

Fubá 20 g
 Ágar..... 10 g
 Tween 80..... 5 ml

Preparo:

- Adicionar o fubá em 250 ml de água e ferver até borbulhar. Filtrar o fubá em gaze dobrada em quatro. Dissolver o ágar em 250 ml de água. Restaurar o volume da infusão de fubá para 250 ml com água quente, juntar as suspensões, ajustar o pH para 6,6 – 6,8 e adicionar o Tween 80. Distribuir volumes de 5 ml em tubos e esterilizar em autoclave a 120°C por 15 minutos.

1.7 Glossário

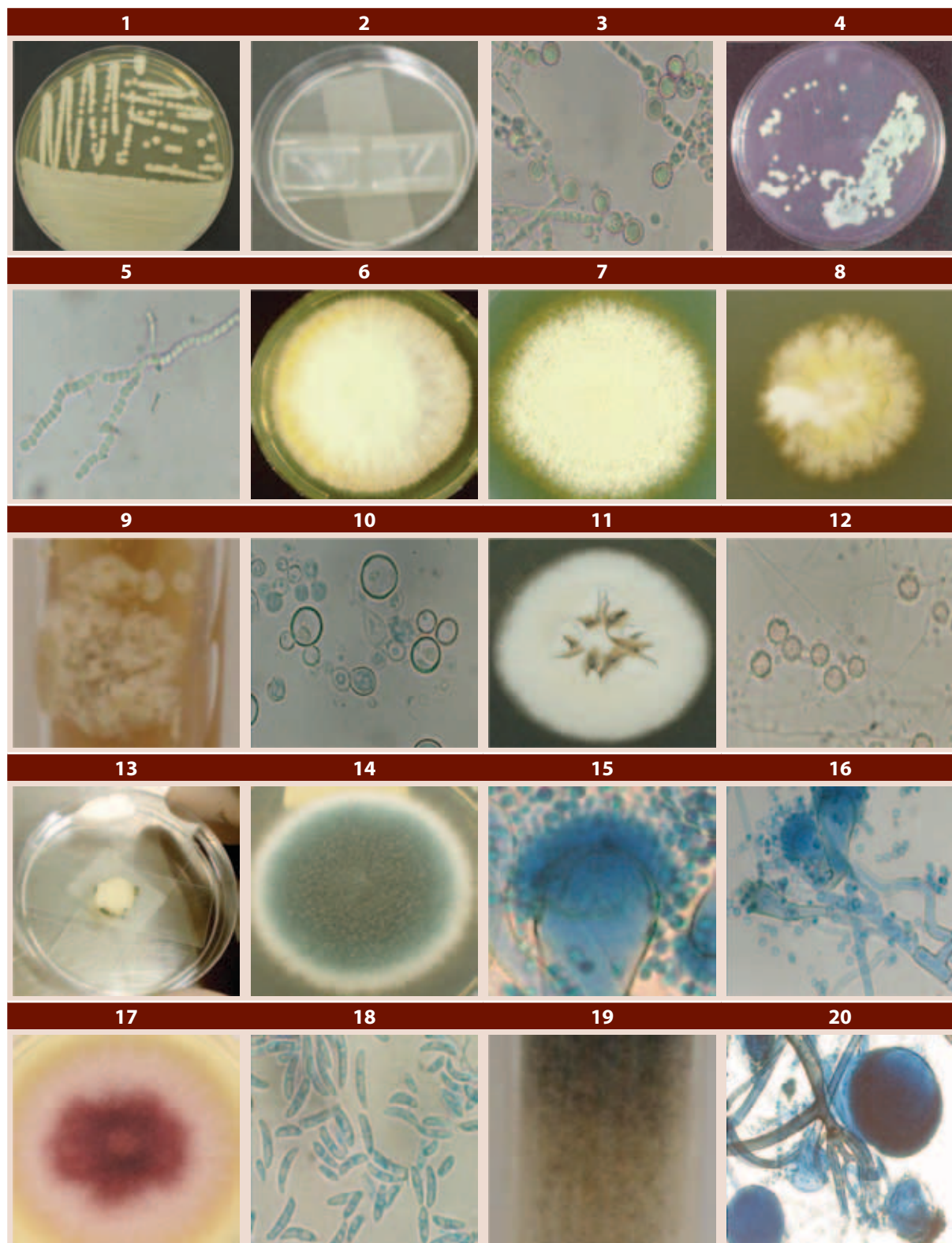
- Artrósporo ou artroconídio: esporo formado pela desarticulação da hifa de fungos filamentosos ou leveduras.
- Blastosporo ou blastoconídio: esporos formados por brotamento ou gemulação.
- Bolor: fungo filamentoso, multicelular, constituído de hifas.
- Brotamento ou gemulação: reprodução com divisão de citoplasma através de estrangulamento.
- Cenocítica: hifa desprovida de septos, o mesmo que hifa contínua.
- Clamidósporo: estruturas de resistência, constituídas de reserva nutritiva e membrana bastante espessa, permitindo resistir aos fatores externos, semelhante aos esporos.
- Conídio: esporo assexuado externo.
- Demácio ou demaciáceo: fungos negros que têm pigmento melanóide (acastanhado), na parede celular.
- Dimórfico: que apresenta duas formas: leveduriforme e filamentosa.
- Esporângio: órgão de reprodução assexuada interna, geralmente em forma de vesícula e contém inúmeros esporos denominados de esporangiosporos.
- Feo-hifomiceto: fungo filamentoso demáceo.
- Hialino: que não tem cor, translúcido, assumindo a cor do corante utilizado.
- Hifa: reunião de células justapostas, formando estrutura tubular, filamentosa, que compõe o corpo vegetativo dos bolores e de alguns gêneros de leveduras (por ex, *Candida spp.*).
- Hifomiceto: fungo filamentoso.
- Levedura: fungo em regra unicelular que se reproduz geralmente por brotamento.
- Pseudohifa: uma série de blastoconídios que permanecem aderidos uns aos outros, formando filamentos semelhantes a hifas.
- Tuberculado: com granulações ou nodosidades.

1.8 Referências

1. HOOG, G.S, GUARRO, J., FIGUERAS, M.J. and GENE, J. Atlas of Clinical Fungi, 2a Ed., CBS, Utrecht, Holanda, 2000.
2. KANE, J., SUMMERBELL, R., SIGLER, L., KRAJDEN, S. and LAND, G. Laboratory handbook of Dermatophytes: a Clinical Guide and Laboratory Manual of Dermatophytes and Other Filamentous Fungi from skin, Hair and Nails, Star Publishing Co., Belmont, Ca, 1997.
3. KURTZMAN, C.P. and FELL, J.W. (coord.) The Yeasts – A taxonomic study, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Holanda, 1998.
4. KWON-CHUNG, K.J. and BENNETT, J. E. Medical Mycology, 1992.
5. LACAZ C.S., Porto, E., MARTINS, J.E.C., HEINS-VACCARI, E.M. and MELO, N.T. Tratado de Micologia Médica, 9a ed., Sarvier, São Paulo, 2002.

6. LACAZ, C. da S., PORTO, E., HEINS-VACCARI, E.M. and MELO, N.T. Guia Para Identificação de Fungos Actinomicetos e Algas de interesse médico, 8º ed., ed. Sarvier, São Paulo, 1998.
7. LARONE, D.H. Medically Important Fungi: A guide to Identification, 3º ed., Washington, DC., 2000.
8. MAZA, Pezzlo and Baron Atlas de Diagnóstico em Microbiologia, ed. Artmed, Porto Alegre, 1999.
9. MENDES-GIANNINI, M.J. and MELHEM, M.S.C. FUNGOS In: FERREIRA, A.W. and ÁVILA, S.L.M. Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Auto-Imunes, 2ªed., Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 2001.
10. MIDLEY, G., CLAYTON, Y.M. and HAY, R.J. Diagnóstico em cores. Micologia Médica, Ed. Manole Ltda., São Paulo, 1998.
11. MINAMI, P.S. Micologia: Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses, Ed. Manole Ltda, São Paulo, 2003.
12. RIPPON, J.W. Medical Mycology: The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes, 2ª ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1982.
13. SIDRIM, J.J.C. and MOREIRA, J.L.B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Guanabara-Koogan, Rio de Janeiro, 1999.
14. VON NOWAKONSKY, A., SILVA, C.R.N. and MELHEM, M.S.C. Fungos e Aids: diagnóstico de infecções oportunistas, ed. Ministério da Saúde, Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids, Série Telelab no22, 2001.
15. ZAITZ, C., CAMPBELL, I., MARQUES, S.A., RUIZ, L.R.B. and SOUZA, V.M. Compêndio de Micologia Médica, ed. Medsi, Rio de Janeiro, 1998.

Prancha 1



Prancha I – Legenda

- Figura 1: Macromorfologia de *Candida albicans* em ágar Sabouraud.
- Figura 2: Placa de Petri preparada com filamentação.
- Figura 3: Aspecto microscópico da filamentação de *Candida albicans*.
- Figura 4: Macromorfologia de *Cryptococcus neoformans* em ágar Sabouraud.
- Figura 5: Artroconídios de dermatófitos em exame direto de material clínico.
- Figura 6: Macromorfologia de *Microsporum canis* em ágar Sabouraud.
- Figura 7: Macromorfologia de *Trichophyton mentagrophytes* em ágar Sabouraud.
- Figura 8: Macromorfologia de *Epidermophyton floccosum* em ágar Sabouraud.
- Figura 9: Macromorfologia de *Paraccocidioides brasiliensis* a 37° C.
- Figura 10: Micromorfologia de *Paraccocidioides brasiliensis* a 37° C.
- Figura 11: Macromorfologia de *Histoplasma capsulatum* a 25° C.
- Figura 12: Micromorfologia de *Histoplasma capsulatum* a 25° C.
- Figura 13: Placa de Petri preparada com microcultivo.
- Figura 14: Macromorfologia de *Aspergillus fumigatus*.
- Figura 15: Micromorfologia de *Aspergillus fumigatus*.
- Figura 16: Micromorfologia de *Aspergillus fumigatus* evidenciando a “célula pé”.
- Figura 17: Macromorfologia de *Fusarium solani*.
- Figura 18: Micromorfologia de *Fusarium solani*.
- Figura 19: Macromorfologia de *Rhizopus sp.*
- Figura 20: Micromorfologia de *Rhizopus sp.*

